

SAFB1, an RBMX-binding protein, is a newly identified regulator of hepatic SREBP-1c gene

著者	大村 寧
発行年	2009-03-25
その他の言語のタイトル	肝ステロール調節エレメント結合蛋白質-1cの新規転写調節因子としての、RBMX結合蛋白質 : SAFB1の同定 カン ステロール チョウセツ エレメント ケツゴウタンパクシツ 1c ノ シンキ テンシャ チョウセツインシ トシテノ RBMX ケツゴウ タンパクシツ : SAFB1 ノ ドウテイ
URL	http://hdl.handle.net/10422/281

氏 名 大 村 寧

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 5 8 6 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 1 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 SAFB1, an RBMX-Binding Protein, is a Newly Identified Regulator of
Hepatic SREBP-1c Gene

(肝ステロール調節エレメント結合蛋白質-1c の新規転写調節因子とし
ての、RBMX 結合蛋白質 : SAFB1 の同定)

審 査 委 員 主 査 教 授 田 中 俊 宏

副 査 教 授 佐 藤 浩

副 査 教 授 大 久 保 岩 男

論文内容要旨

※整理番号	591	氏名 (ふりがな)	おがむら やすし 大村 寧
学位論文題目	SAFB1, an RBMX-Binding Protein, is a Newly Identified Regulator of Hepatic SREBP-1c Gene (肝ステロール調節エレメント結合蛋白質-1c の新規転写調節因子としての、RBMX 結合蛋白質:SAFB1 の同定)		
<p>【目的】</p> <p>我々はマウスには高果糖食で代謝異常が誘導される系統(CBA)と誘導されない系統(DBA)が存在し、CBA では果糖食により脂肪合成系酵素群の転写因子である sterol regulatory element-binding protein 1c(SREBP-1c)の肝臓での発現が著しく亢進していることを報告した。また、CBA、DBA 間で SREBP-1c のプロモーター領域の塩基配列を比較すると、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism:SNP, -468 G to A)が存在し、その領域を認識し DNA- 蛋白質複合体を形成する核蛋白質として、RBMX (RNA binding motif on the X chromosome)が同定できた。RBMX の過剰発現により SREBP-1c のプロモーター活性が約 5 倍上昇し、knock down では 50%以下に低下したが、RBMX は直接 SREBP-1c のプロモーター領域に結合しないことが明らかになった。また RBMX には他のタンパク質との相互作用が知られているものの、DNA 結合領域の存在や、転写活性化因子としての報告はない。そこで、RBMX が何らかの結合蛋白を介した間接的な作用により、SREBP-1c 遺伝子転写活性に影響を与えているのではないかと考え、その候補蛋白の検索を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>1) RBMXと相互作用する蛋白質を検索するために、酵母two-hybrid assayを用いて、RBMXをbaitとしてCBAマウスの肝臓から作成したcDNA libraryをスクリーニングした。さらに同定した蛋白質とSREBP-1c遺伝子上流域との直接的な結合を酵母one-hybrid assayにて検討した。</p> <p>2)RBMX および同定した蛋白質の、SREBP-1c遺伝子上流域とのin vivoでのDNA-蛋白質結合を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) にて確認した。</p> <p>3) RBMXと同定した蛋白質との直接的な結合を、免疫沈降法にて確認した。</p> <p>4) Fao (ラット肝腫瘍) 細胞において、同定した蛋白質に対する siRNA を用いて同遺伝子の発現抑制を行い、SREBP-1c の mRNA に与える影響を遺伝子発現定量法 (real-time PCR 法) で、また SREBP-1c プロモーター活性に与える影響をレポーターアッセイ (ルシフェラーゼ法) により解析した。</p> <p>5) 同定した蛋白質の全長 cDNA を pcDNA3.1 発現ベクターにクローニングし、Fao 細胞に導入し高発現させた。その条件下において SREBP-1c プロモーター活性に与える影響を、レポーターアッセイにより解析した。</p> <p>同定した蛋白質の RNAi 法による特異的な発現抑制および過剰発現の効果は、細胞内蛋白発現量 (イムノブロット法) により確認した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

- 1) 酵母two-hybrid assayを用いて、Scaffold attachment factor B1 (SAFB1)をRBMXと相互作用する蛋白質の候補として同定した。しかし、酵母one-hybrid assay で、SAFB1はSREBP-1c遺伝子上流-468番塩基領域に直接結合しないことがわかった。
- 2) ChIP assay にて、抗 SAFB1 抗体、抗 RBMX 抗体によりともに CBA マウスの肝臓において SREBP-1c 遺伝子上流-468 番塩基領域の DNA が沈降し、SAFB1 および RBMX と同 DNA 領域との結合を確認した。
- 3) 免疫沈降法により、CBA マウスの肝臓において SAFB1 および RBMX が結合していることを確認した。
- 4) SAFB1 の siRNA により SREBP-1c mRNA 発現およびプロモーター活性が約 50%にまで抑制され、RBMX 過剰発現により上昇した SREBP-1c プロモーター活性も約 70%抑制された。
- 5) SAFB1 単独の過剰発現では、SREBP-1c プロモーター活性化に有意な変化が見られなかったが、RBMX 過剰発現下に SAFB1 を過剰発現させたところ、有意な活性化が見られた。

【考察】

本研究により、酵母 two-hybrid 法を用いて、RBMX と結合し肝臓での SREBP-1c 遺伝子転写調節に関与する分子として、新たに SAFB1 を同定した。また RNAi 法による内在性の SAFB1 発現抑制および SAFB1 過剰発現の結果より、RBMX による SREBP-1c の転写調節に SAFB1 が関わっていることが予測できた。

SAFB1 は肝臓において SREBP-1c を活性化するのに十分な量が存在し、RBMX がその律速段階となっていると考えられる。一方、RBMX が過剰発現された条件下では、十分な SREBP-1c 活性化のためには更なる SAFB1 の発現が必要と推測される。SAFB1 は SREBP-1c 遺伝子上流-468 番塩基領域と直接結合してはいないが、RBMX の coactivator として肝における SREBP-1c 転写活性に働いている可能性が示唆された。

しかし本研究では、RBMX および SAFB1 が SREBP-1c 遺伝子上流領域に直接結合する機構を証明できておらず、今後さらなる解析が必要である。

【結論】

RBMX による肝臓での SREBP-1c 遺伝子転写調節に関与する分子として、新たに SAFB1 を同定した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	591	氏名	大村 寧
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究は、酵母 two-hybrid assay を用いて、高果糖食による肝臓での SREBP-1c の転写を調節する蛋白質 RBMX と結合する蛋白質 SAFB1 を同定し、その転写調節機構について解析したものである。</p> <p>免疫沈降法にて SAFB1 および RBMX が結合すること、ChIP assay にて SAFB1・RBMX とともに SREBP-1c 遺伝子上流領域に結合することを実証した。また培養細胞系を用いて、遺伝子過剰発現および発現抑制により SREBP-1c 遺伝子転写活性を調節しうることを示した。以上より肝臓において SAFB1 は RBMX と複合体を形成し、SREBP-1c 遺伝子転写調節に関与すると考えられた。</p> <p>本論文は高果糖食の代謝異常の誘導において、SAFB1 による SREBP-1c 遺伝子転写調節が重要であることを実証したものであり、臨床的にも示唆に富むものである。よって博士（医学）の学位を授与するに値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2009 年 2 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け合格と認められた。</p> <p style="text-align: right;">(平成 21 年 2 月 4 日)</p>			